

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 京原 麻由

横浜市立大学大学院医学研究科 分子内分泌・糖尿病内科学

審査員

主査 横浜市立大学大学院医学研究科教授 梁 明秀

副査 横浜市立大学大学院医学研究科教授 小川 毅彦

副査 横浜市立大学大学院医学研究科准教授 石上 友章

博士の学位論文審査結果の要旨

Serum quantitative proteomic analysis reveals soluble EGFR to be a marker of insulin resistance in male mice and humans.

(糖尿病マウス血清のプロテオーム解析により同定された soluble EGFR はインスリン抵抗性の指標となるバイオマーカー候補である)

[発表要旨]

近年、糖尿病の発症進展において、血清由来の液性因子の関与が多数報告されている。本研究では肥満糖尿病モデル db/db マウスを用いて、実験 1 として 4, 8, 12, 24 週齢の db/db マウス血清を用いたプロテオーム解析、また、実験 2 として糖尿病薬である GLP-1 受容体作動薬のリラグルチド (LIRA) を投与した db/db マウス血清を用いたプロテオーム解析を行った。4-24 週齢の db/db マウス血清で低下し、LIRA 投与で回復した 6 タンパク質 (Haptoglobin, Epidermal growth factor receptor, Complement component C8 alpha chain, Complement component C8 beta chain, Complement component C8 gamma chain, Complement factor D) のうち、Epidermal growth factor receptor (EGFR, 血清中で soluble EGFR として存在) に着目、血清 ELISA、肝臓、脂肪組織の遺伝子発現においても同様の変化を確認した。血清 soluble EGFR 濃度は、高脂肪食負荷マウス、ob/ob マウスで低下し、膵β細胞特異的グルコキナーゼ欠損マウス、streptozotocin 投与マウスで上昇していた。また、インスリン受容体/IGF-1 受容体チロシンキナーゼ阻害薬投与マウスでは、血清 soluble EGFR は上昇していた。これらの結果から、血清 soluble EGFR 濃度は、インスリン受容体シグナル伝達の活性と逆相関する可能性が示唆された。ヒト血清 soluble EGFR 値は、2 型糖尿病患者 $65.8 \pm 11.0 \text{ ng/ml}$ 、非糖尿病患者 $61.9 \pm 5.6 \text{ ng/ml}$ であり、有意差はみられなかった。2 型糖尿病患者と非糖尿病患者を合わせたヒト血清 soluble EGFR 値は、空腹時血糖 ($r=0.49$, $p<0.01$), HOMA-IR ($r=0.37$, $p=0.03$), HbA1c ($r=0.39$, $p=0.01$) と正の相関を認めた。以上より、db/db マウスの血清プロテオーム解析により同定された soluble EGFR は、インスリン抵抗性や糖尿病治療効果を反映する可能性がある、新規糖尿病バイオマーカー候補である。ヒト糖尿病バイオマーカーとしては、今後被験者数を増やして、さらなる検討が必要である。

審査にあたり、上記論文要旨の説明後、以下の質疑応答がなされた。

まず、石上副査により以下の質問があった。

- 1) 今回 db/db マウスにリラグルチドを投与したが、なぜ糖尿病モデルマウスを選んだのか。糖尿病ではない正常マウスにリラグルチドを投与し解析した方が、リラグルチド投与による変化が明らかになるのではないか。
- 2) db/db マウスに対して食事制限をして、肥満と糖尿病を発症しないようにした検討はされているか。

- 3) 今回検出されたタンパク質のうち、なぜ EGFR を選んだのか。EGFR 以外に検出されたタンパク質、Complement component C8 については、検討を行っているか。
- 4) 今後 soluble EGFR がヒト糖尿病バイオマーカーとして実用化する場合に、既存のバイオマーカーとの相違点は何か。

以上の質問に対し、以下の回答がなされた。

- 1) 糖尿病モデルである db/db マウスにおいてリラグルチド投与で変化したタンパク質は、正常マウスを用いた場合よりも、より糖尿病に関与するタンパク質を同定できると考えた。
- 2) db/db マウスに対して食事制限をする検討は行っていない。
- 3) EGFR はリラグルチド投与による発現量変化が大きいいため、今回まず検討を行った。Complement component C8 の検討は行っていない。今後検討したい。
- 4) HbA1c などの既存の糖尿病バイオマーカーは、糖尿病発症早期の変化を反映しにくい。Soluble EGFR は、糖尿病発症前や発症初期からの変化を反映する可能性がある。

次に、小川副査により以下の質問があった。

- 1) 糖尿病発症初期の変化を捉えるバイオマーカーであるなら、健常人と糖尿病患者で値に差がつく必要がある。今回、非糖尿病患者群と糖尿病患者群の血清 soluble EGFR 濃度に有意差がなかったが、どう考えるか。
- 2) リラグルチド投与で発現量が変化したタンパク質群と、糖尿病マウスで発現量が変化したタンパク質群を重複させて候補タンパク質を抽出したが、重複させる意味は何か。
- 3) プロテオーム解析で同定された EGFR 以外のタンパク質についても、ヒト血清で解析を行っているか。
- 4) 健常人の血清検体にバイオバンクの利用はどうか。

以上の質問に対し、以下の回答がなされた。

- 1) 今回、非糖尿病患者群として、肥満症や内分泌疾患の患者を選択しており、今後 healthy volunteer の検体を含めることを検討したい。
- 2) 今回、糖尿病マウスで発現量が低下したタンパク質が、リラグルチド投与により回復したタンパク質を抽出した。これにより、リラグルチド投与による発現量変化が、実際に糖尿病病態に関与しているタンパク質のみを抽出できていると考える。
- 3) EGFR 以外のタンパク質についても、現在測定中である。
- 4) 今回は血清インスリンなど糖代謝のパラメータとの関連をみるために、内分泌・糖尿病内科の非糖尿病患者の血清をコントロールとした。

最後に、梁主査により以下の質問があった。

- 1) 血清 soluble EGFR 濃度がインスリン受容体シグナル活性と逆相関する、という考察だが、リラグ

ルチド投与マウスはコントロールマウスと比較して血清インスリン値に差がなかったにも関わらず、血清 soluble EGFR 濃度は上昇していた。この点はどう説明するか。

- 2) 肝臓・脂肪組織の EGFR 遺伝子発現について、EGFR mRNA のスプライシングバリエントも測定したか。
- 3) インスリンシグナルが活性化すると、EGFR のシグナルも活性化されるか。
- 4) リラグルチド投与で発現量が変化したタンパク質群と、糖尿病マウスで発現量が変化したタンパク質群を重複させて候補タンパク質を抽出したが、どのようなタンパク質を想定してこのように抽出したのか。
- 5) リラグルチドは糖尿病患者の治療としては、発症早期に使う薬か。そうであれば、例えば糖尿病発症前から発症早期にのみ変化があったタンパク質についても検討したか。また、リラグルチドの未知の作用を探るという点では、糖尿病マウスで変化しなくとも、リラグルチド投与で変化するタンパク質にも着目すべきではないか。
- 6) 健常人や他の疾患における血清 soluble EGFR 濃度についての報告はあるか。

以上の質問に対し、以下の回答がなされた。

- 1) リラグルチドはインスリン分泌の改善作用以外に、肝臓のインスリン抵抗性を改善するという報告があることから、リラグルチドが db/db マウスの過剰なインスリン受容体シグナル伝達を改善したことで、血清 soluble EGFR 濃度が上昇した可能性が考えられる。
- 2) EGFR mRNA のスプライシングバリエントは測定していない。今後解析したい。
- 3) インスリンシグナルの下流には PI3-K/Akt 経路があり、細胞増殖に関与するが、PI3-K/Akt 経路は EGFR シグナルの下流の経路でもある。
- 4) 今回は糖尿病のバイオマーカーになるタンパク質を抽出することを目的に、糖尿病発症前から発症後期まで一貫して変化があり、リラグルチド投与で改善するタンパク質を抽出した。
- 5) リラグルチドはインスリン分泌が枯渇すると効果がないため、糖尿病発症初期から中期までで使用する薬である。糖尿病の病態に関与する可能性がある糖尿病発症前から発症早期の時期にのみ変化したタンパク質群や、リラグルチド投与でのみ変化するタンパク質群についても、今後解析を検討していきたい。
- 6) 血清 soluble EGFR は腫瘍マーカーとしての検討が多くされており、癌患者では低下するという報告が多い。

これら以外にもいくつかの質問がなされたが、申請者によりいずれも的確な返答がなされた。また、申請者が本研究に十分に貢献していることを確認した。本研究は、糖尿病の新規バイオマーカーや新たな治療戦略に繋がりうる学術的価値の高い研究であると判断された。申請者は本学位論文の内容を中心に質問に的確に答え、本課題における深い理解と洞察力を持っていることを示した。以上より申請者は医学博士を授与されるにあたり相当であると判定した。以上の審査より、申請者は本学の学位（博士）を授与されるにふさわしいと判断された。